om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Zur Phosphorfrage im Chlorophyll

von

V. Brdlík.

Aus der chem.-physiologischen Versuchstation der k. k. böhmischen technischen Hochschule in Prag.

(Vorgelegt in der Sitzung vom 19. Juni 1908.)

Die ersten Arbeiten, welche die Lösung der Chlorophyllfrage in sicherere Geleise brachten, waren diejenigen von Gautier und Hoppe-Seyler. Die fast gleichzeitig, jedoch in ganz getrennten Studien von beiden Forschern gewonnenen krystallinischen Chlorophyllfarbstoffe waren fast von identischer elementarer Zusammensetzung. (Einen kleinen Unterschied in der Zusammensetzung des gewonnenen Produktes erklärt Gautier damit, daß er zu seinen Arbeiten dicotyledone, Hoppe-Seyler dagegen monocotyledone Pflanzen benützte.) Beide Forscher fanden in der Asche ihrer Präparate Phosphor, und zwar Hoppe-Seyler 1·3% Phosphor, Gautier 1·75% phosphorhältiger Asche. Damals stellte auch Hoppe-Seyler, gestützt auf diese Forschungsergebnisse, die Hypothese der Lecithinkonstitution des Chlorophylls auf. Durch die ausgezeichneten Arbeiten von Marchlewski und Schunk wurde die Chemie der Chlorophyllfarbstoffderivate sehr vertieft, obwohl die Frage der Lecithinkonstitution von ihnen nicht näher untersucht worden ist. Später hat Stoklasa[1] in seinen Publikationen, betreffend das »Chlorolecithin« den Lecithin charakter des Chlorophylls bestätigt. Neuestens hat Willstätter[2] in bezug auf die Chlorophyllfrage Arbeiten ver-

[1] J. Stoklasa: »Über die Verbreitung und physiolog. Bedeutung des Lecithins in der Pflanze. Sitzungsber. der k. k. Akademie der Wissenschaften in Wien, Mathem.-naturw. Klasse, B. CIV, Abt. 1 (1896).

[2] Richard Willstätter, Just. Liebig's Annalen der Chemie, Bd. 350, H. 1, 2, »Untersuchungen über Chlorophyll« und Bd. 358, H. 3 (1908). »Über krystallisiertes Chlorophyll«.

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

öffentlicht, welche die Konstitution des Chlorophylls auf das Vorhandensein des Magnesiums fundierten. Die verschwindende Menge von Phosphor (0·07%), die er im Extrakte des Rohchlorophylls fand, obwohl er an einer anderen Stelle auch 0·44% angibt — schreibt er jedoch den farblosen Verunreinigungen zu.

Damit wäre die Phosphorkonzeption des Chlorophylls definitiv abgetan gewesen, wenn unsere Resultate nicht fundamental gegen diejenigen Willstätters differieren würden.[1]

In 18 Analysen von Rohchlorophyll bewegte sich der Phosphorgehalt je nach Art der Pflanzengattung zwischen 0·35% bis 1·54%. Niemals wurde aber ein so geringer Phosphorgehalt von uns gefunden, wie ihn Willstätter angibt (0·07%). Auch haben wir den Phosphor in den Chlorophyllextrakten der grünen und gelben Blätter von Ahorn, gepflückt im Monate September, und zwar am selben Tage und von dem selben Baumindividuum, verfolgt. Die grünen Blätter von Ahorn enthielten:

0·518% Phosphor.

Die gelben Blätter von Ahorn enthielten:

0·036% Phosphor.

Es war daher klar, daß mit der Zersetzung des Chlorophylls der Phosphor aus den Blättern verschwindet, d. h. aus den gelben alkoholischen, respektive Benzolextrakten der gelben Blätter, in denen eine wahrnehmbare Menge derselben nicht mehr konstatierbar war. Diese Beobachtung machten auch andere, welche neben dem Phosphor auch das Magnesium verfolgten (in der Trockensubstanz der Blätter), welch letzteres, zum Unterschiede vom Phosphor, bei dem Vergilben, also der Zersetzung des Chlorophylls aus den Blättern nicht verschwindet. Tswett,[2] welcher die Frage über die Wanderung des Phosphors und der

[1] J. Stoklasa, V. Brdlík, J. Just, Ist der Phophor an dem Aufbau des Chlorophylls beteiligt? Ber. d. d. bot. G. (1908), p. 69.

[2] M. Tswett, Ber. d. d. bot. Gesellschaft, Bd. XXVI, *a)* H. 1. »Über die Verfärbung und die Entleerung des absterbenden Laubes«.

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Magnesia aus den vergilbenden Blättern erörtert, spricht sich in folgender Weise aus:

»Stahl hat neuerdings den Chemismus des Vergilbens der Blätter in der Weise biologisch zu deuten versucht, daß der immer aus C, O und H bestehende gelbe Anteil des Chlorophylls als wertlos in dem Blatte zurückbleibt, während der »grüne Anteil«, welcher (nach Willstätter) außer den genannten Organogenen noch N, Mg und eventuell P enthält, sich zersetzt, wobei die wertvollen N und Mg durch Ableitung in den Stengel für die Pflanzen erhalten bleiben. Wie die im vorstehenden Aufsatz angeführten Tatsachen lehren, findet aber ein herbstliches Rückwandern des Mg nach dem vorliegenden Beobachtungsmaterial nicht statt. Ferner ist der »grüne Anteil« des Chlorophylls aus zwei Chlorophyllinen zusammengesetzt und es bleibt noch die Frage zu erledigen, ob beide Farbstoffe Mg-haltig sind. Beide Farbstoffe schwinden jedoch beim Vergilben, wie auch die gelben Farbstoffe nicht unzersetzt bleiben.«

Die Beobachtung der Wanderung des Phosphors, welche, wie Tswett angibt, von Tollens, Tucker, Rissmüller und Seissel ebenfalls gemacht wurde, wobei jedoch diese Forscher in bezug auf den konstanten Gehalt an Magnesia in den vergilbenden Blättern übereinstimmen, muß zu der Ansicht führen, daß zwischen der Bildung des Chlorophylls und der Gegenwart des Phosphors in der Pflanzenzelle bestimmte Beziehungen bestehen.

Indem wir die Frage über die Gegenwart des Phosphors in den Extrakten des Rohchlorophylls nach so vielen Bestätigungen (Gautier, Hoppe-Seyler, Stoklasa, Etard, Marchlewski, Winterstein und Hiestand und unsere p. 530 zitierte Arbeit), als gelöst erachten, versuchten wir es sicherzustellen, in welcher Form der von uns gefundene Phosphor sich im Rohchlorophyll vorfindet. Zu diesem Zwecke extrahierten wir $120^1/_2$ *kg* Spinatblätter mit 230 *l* chemischreinen Methylalkohols. Frisch gepflückter Spinat wurde gewaschen, getrocknet, d. h. in der Weise, daß das zur Durchspülung verwendete Wasser abgedampft wurde, worauf die so getrockneten Blätter in einer emaillierten Mühle zerrieben wurden. Behufs Neutralisation der

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

organischen Säuren im Extrakte wurde diesen etwas kohlensaurer Kalk hinzugefügt. Der erhaltene alkoholische Extrakt von 188 *l* wurde mit 48 *l* chemisch reinen (thyofenfreien) Benzols ausgeschüttelt. Die Benzolschicht des Chlorophylls (43 *l*) wurde bei etwa 40° C. abgedampft. Es wurden 65 *g* gewonnen. Diese wurden behufs Entfernung der Stoffe, welche beim Ausschütteln aus der Alkoholschicht teilweise in die Benzolschicht gelangten, in Benzol aufgelöst.

Wir entschlossen uns sodann, den nach Abdampfen dieser Benzollösung erhaltenen Rückstand, behufs Trennung des Chromophors, direkt zu verseifen, so wie Hoppe-Seyler dies bereits getan hat. Dieser Weg wurde im Sinne des nachstehenden Kalkuls eingeschlagen.

Wir waren uns dessen bewußt, daß das Chlorophyll, welches wir durch die Extraktion der grünen Blätter gewinnen, nur mehr ein postmortales Produkt ist, keineswegs ein Chlorophyll, das im grünen Blattwerk vorkommt. Es ist auch sichergestellt, daß es nicht bloß eine Art von Chlorophyll gibt, sondern daß ihrer mindestens zwei existieren müssen, wie Sorby und Marchlewski gefunden und Tswett durch seine Chromato-Adsorptionsmethode bestimmt nachgewiesen hat.

In bezug auf das physikalische Verhalten hat schon Monteverde ein krystallisiertes und ein amorphes Chlorophyll gefunden. Etard spricht sich über die Möglichkeit des Vorhandenseins verschiedener Chlorophyllarten also aus: »Inutile de les ramener à quelques séries connues car elles sont indéfinement nombreuses et la Nature crée les types chimiques qu'elle veut.« Er fand selbst in den reinsten seiner Chlorophyllpräparate, wie er angibt, je nach der Art der Pflanzen, aus denen dieselben gewonnen waren, P, K, Cl, S, Fe, Mn, Si und in einer Art konstatierte er sogar Kupfer. Gegen die Befunde Etard's sprechen, soweit es sich um das Eisen handelt, die Angaben Molisch's,[1] Gautier's und anderer. Was das Magnesium anbelangt, so wurde beobachtet, daß sich dieses sehr leicht aus dem Rohchlorophyll ausscheidet. Durch all das Angeführte ist es klar, welch eine labile Materie das Chlorophyll

[1] H. Molisch, Die Pflanze in ihren Beziehungen zum Eisen, Jena, 1892.

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

wohl sein mag, geneigt, durch unbedeutende Einflüsse sich an Metalle zu binden, welche möglicherweise zu seinem Moleküle in vivo nicht gehören, andrerseits aber jene auszuscheiden, die seine Komponente bilden. Auf diese Weise wäre vielleicht die Differenz zwischen den quantitativen Phosphorbefunden Willstätters und den unsrigen zu erklären. Betreffs des Magnesiums ist das Verschwinden desselben aus dem Rohchlorophyll bei der Operation schon erklärt (Willstätter), bei Phosphor allerdings noch nicht. Damit durch die Reinigungsoperationen manches der Chlorophyllpigmente nicht ausgeschieden werde, wurde von weiteren Reinigungsoperationen Umgang genommen und das so erhaltene Rohchlorophyllpräparat direkt verarbeitet, wie dasselbe durch Ausschüttelung mittels Benzols und wiederholter Lösung des benzoligen Rückstandes gewonnen wurde und der negative Beweis bevorzugt, daß die isolierten zersetzbaren Produkte nicht den farblosen Beimengungen angehören. Den Versuch der Trennung der einzelnen Chlorophyllfarbstoffe haben wir unterlassen, von der Erwägung ausgehend, daß der Konstitutionskern allen Chlorophyllpigmenten gemeinsam sein dürfte, daß nur die verschiedenen Chromogenkomponenten zu den gefundenen Chlorophyllpigmenten führen können, und daß wir diesen Konstitutionskern im verseiften Filtrat erhalten, wie dies auch Hoppe-Seyler von diesem Kern voraussetzt. Diese unsere Methode erwies sich als richtig, selbst nach den neuesten (nach Abschluß der unsrigen) veröffentlichten Arbeiten Willstätters, betreffend die Gewinnung des sogenannten Monteverdeschen krystallinischen Chlorophylls, von welchem jedoch Tswett sich also äußert: Es sei jedoch schon hier betont, daß dieses Präparat erwiesenermaßen keinen genuinen Farbstoff, sondern ein Artefakt, augenscheinlich eine Verbindung der Chlorophylline α und β mit einem dritten Stoffe darstellt.

Übrigens haben wir mit Hilfe spektrophotometrischer Methode[1] sichergestellt, daß die gebräuchlichen Reinigungsoperationen kein intaktes Chlorophyll liefern.

[1] Über deren Resultate ehestens referiert werden soll.

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Verseifung des Rohchlorophylls.

Der so erhaltene Rückstand wurde nach Abdampfen des Benzols durch Kochen mit konzentriertem Barythydrat verseift. Das überschüssige $Ba(OH)_2$ wurde in gebräuchlicher Weise mittels Durchleitens von CO_2 herausgefällt und nach der Abkühlung filtriert. Auf dem Filter wurden, neben verschiedenen Barytseifen, unlösliche Barytsalze der sogenannten Chlorophylansäuren festgehalten, welche nach Hoppe-Seyler als Chromogen des Chlorophylls angesehen werden. Das Filtrat wurde abgedampft (mit einigen Tropfen HCl behufs Überführung eventuell vorhandener freier Basen in Chlorhydrate angesäuert) und der Rückstand einigemal mit absolutem Alkohol digeriert und auf diese Weise das Filtrat in eine Partie alkoholischer Lösung und einen nach der alkoholischen Digestion im Wasser löslichen Rückstand geteilt. Ein bloß unbedeutender, Phosphor nicht enthaltender Teil blieb im Wasser unlöslich.

A. Alkoholischer Teil.

Der alkoholische Teil ließ auf Grund der qualitativen Reaktionen der Phosphorwolframsäure, Kaliumplatinjodid, Jod-Jodkalium sowie in der alkoholischen Lösung der Platinchloridsäure auf die Anwesenheit einer Base schließen. Zur Identifikation wurde Platinchloridsalz gewählt; der durch die Platinchloridsäure gefällte Niederschlag wurde auf einem Filter gesammelt und nach erfolgter Durchspülung mit absolutem Alkohol im Wasser gelöst und krystallisieren gelassen.

In den Krystallen der ersten Krystallisationsfraktion, welche bei Verbrennung auf dem Platinblech den Geruch von Trimethylamin nicht zeigten, wurde spektralanalytisch Kalium festgestellt. Die Krystalle der zweiten Fraktion ergaben den Geruch von Trimethylamin, enthaltend 36·5% Pt.

Die letzte Krystallisationsfraktion ergab 32·58% Pt, kam also dem Cholinplatinchlorid ev. Neurinplatinchlorid nahe.

0·0982 *g* der Substanz = 0·032 *g* Pt = 32·58% Pt. Im Platinchloridniederschlag fand sich in der letzten Fraktion noch Kali. Zur Trennung des letzteren von Cholin, als welches sich die Base auch erwies, wurde die Methode von Staněk benützt,

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

um gleichzeitig zu konstatieren, ob Betaine im Rohchlorophyll vorhanden gewesen sind. Es wurde jedoch sichergestellt, daß Betaine nicht in den benzoligen Anteil übergegangen sind. Die aus der wässerigen Lösung mittels Jod-Jodnatriums ausgeschiedenen Perjodide wurden durch Erwärmen mit Wasser unter Hinzufügung pulverisierten Kupfers in Jodhydrate und schließlich mit Hilfe von Kupferchlorid und Kupfer in Chlorhydrate überführt. Die alkoholische Lösung dieses Chlorhydrats wurde mittels einer alkoholischen Lösung von Chlorplatinsäure gefällt. Der Niederschlag wurde nach Auswaschen mit Alkohol in Wasser gelöst und der Krystallisation überlassen. Die orangegelben, bei 120° getrockneten Täfelchen gaben beim Verbrennen eine Menge Platin, die auf Gegenwart von Cholin, eventuell Neurin deutete.

I. 0·1235 *g* gaben durch Verbrennen 0·03945 *g* Pt = 31·94%.
II. 0·1164 *g* gaben durch Verbrennen 0·0374 *g* Pt = 32·13%.

Die zurückbleibenden Krystalle wurden in Wasser aufgelöst, mittels Schwefelwasserstoffs in Chlorhydrat überführt und wieder das Cholinplatinchlorid ausgeschieden.

0·1962 *g* gaben durch Verbrennen 0·0626 *g* Pt = 31·9%

Cholinplatinchlorid erfordert theoretisch 31·64% Pt. Die sämtlich höheren Platingehaltsziffern, als sie Cholinplatinchlorid theoretisch erfordert, konnten auf ein eventuelles Vorhandensein von Neurin deuten. Deshalb wurde die Probe auf die physiologische Wirkung der isolierten Basen gemacht. Allein selbst die dreifache Dosis letalis bewirkte den Tod der Versuchstiere nicht. Neurin also (das toxisch wirkt) war die Base nicht, was sich auch voraussetzen ließ, da es nicht gut denkbar ist, daß das toxisch wirkende Neurin sich in der Pflanze befinde. Die Anschauung, daß eine Überführung von Cholin in Neurin, während der verschiedenen Operationen eintritt, wird von Gulewitsch zurückgewiesen.

B. Der wässerige Anteil.

Der nach der alkoholischen Digestion zurückbleibende im Wasser lösliche Rückstand gab einen flockigen Niederschlag mit absolutem Alkohol und trübte sich beim Erwärmen;

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

durch Erkalten wurde er wieder klar und lieferte mit Bleiacetat abermals Niederschläge. Diese Reaktionen deuteten auf Bariumglycerinphosphat, welches auch, wie folgt, isoliert und identifiziert wurde. Die konzentrierte Lösung wurde mit absolutem Alkohol gefällt, der Niederschlag auf dem Filter gesammelt und nach erfolgter Durchwaschung mit absolutem Alkohol in kühlem Wasser aufgelöst und von neuem mit absolutem Alkohol gefällt. Diese Operation wurde 5mal wiederholt; der schließlich auf dem Filter gesammelte Niederschlag wurde zum konstanten Gewicht (95°) getrocknet (0·212 *g* Bariumglycerinphosphat). Ein Teil hievon wurde in einer kleinen Menge Wassers aufgelöst und Schwefelsäure zur Ausscheidung von $BaSo_4$ und Bestimmung des Bariums hinzugefügt. Die im Filtrate überschüssige Schwefelsäure wurde mittels Bariumchlorid ausgeschieden, konzentriert und das Glycerin nach der Methode Zeisel und Fanto[1] bestimmt. Das überdestillierende Isopropyljodid wurde im Zeisel'schen Apparate mittels Silbernitrats aufgefangen. Das ausgeschiedene AgJ wurde bei 120° getrocknet und gewogen.

Belege.

I. 0·0953 *g* der Substanz ($BaC_3H_7PO_6+2H_2O$). 0·0658 *g* $BaSO_4 = 0·0387$ *g* = 40·63% Ba (Theorie 40%).
0·059 AgJ = 0·0231 $C_3H_8O_3$ = 24·29% $C_3H_8O_3$ (Theorie 26·78%).

II. 0·1022 *g* der Substanz 0·0702 *g* $BaSO_4$ = 0·0413 *g* Ba = 40·39%
0·0638 *g* AgJ = 0·025 $C_3H_8O_3$ = 24·46%.

Die verhältnismäßig hohen Ziffern für das Barium in Hinsicht auf den festgestellten Glyceringehalt finden ihre Erklärung einesteils in dem unzureichenden quantitativen Verlauf bei der Bestimmung des Glycerins, andrerseits ist es auch möglich, daß bei der Zersetzung des Bariumglycerinphophats mittels Schwefelsäure, behufs Entfernung des Bariums, die frei gewordene Glycerinphosphorsäure sich teilweise zersetzt; im Filtrate verdampft dann beim Konzentrieren ein wenn auch unbedeutender Teil des Glycerins. Glycerinphosphorsäure findet sich daher auch in Rohchlorophyll vor, wie schon Hoppe-Seyler angedeutet hat.

[1] S. Zeisel und R. Fanto, Zeitsch. für d. landw. Versuchswesen in Österreich, p. 729 (1902).

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Versuch einer quantitativen Trennung.

Die Bestimmung des Phosphors im Reste der ursprünglichen Benzollösung hatte für unseren Zweck keine Bedeutung, da sämtlicher Phosphor, wegen unvollständiger Verseifung dieses Restes, in das Filtrat nicht übergeht (durch Parallelversuche wurde festgestellt, daß etwa 20% P zurückbleiben) und deshalb wurde jener Filtratphosphor als Basis unserer weiteren Beobachtungen angesehen.

Das nach der Verseifung resultierende Filtrat wurde auf 2000 cm^3 verdünnt und hievon 50 cm^3 zur Bestimmung des Gesamtphosphors verwendet; es wurden 0·0242 g $Mg_2P_2O_7$ = 0·0067 g P gefunden, somit im ganzen Filtrate 0·2691 g P. Die restlichen 1950 cm^3 wurden abgedampft, mit absolutem Alkohol digeriert und auf diese Weise, so wie es bei den vorherbeschriebenen Identifikationsarbeiten geschehen ist, in zwei Partien: eine alkoholische und eine wässerige Lösung geteilt.

A. Der alkoholische Teil.

In der alkoholischen Fraktion sollte die gesamte Menge des Platins in dem Niederschlage der alkoholischen Lösung der Chlorplatinsäure bestimmt werden; deshalb wurde auf 500 cm^3 verdünnt, hievon auf die Platinbestimmung 25 cm^3 abgeteilt, mit Chlorplatinsäure gefällt und 0·451 g Platin gefunden. Das ist in 500 cm^3 des alkoholischen Teils 9·02 g Platin, d. i. umgerechnet auf die ursprüngliche Menge von 2000 cm^3 des Filtrats 9·25 Pt, welche also die Basen und das Kalium gebunden hatten.

Wie weiter oben angeführt, wurde während der Arbeit das Vorhandensein von Kali in dem ausgeschiedenen Niederschlage der alkoholischen Lösung der Chlorplatinsäure gefunden. Damit die, an das Kali gebundene Platinmenge festgestellt werde, wurde wie folgt vorgegangen.

Die restlichen 25 cm^3 von 500 cm^3 der alkoholischen Digestion wurden, wie weiter oben angegeben, mit einer alkoholischen Lösung von Chlorplatinsäure gefällt. Der Niederschlag wurde aufgefangen, gewaschen und die organischen Stoffe in einem Wasserstoffgasstrom verbrannt. Der Rückstand wurde wiederholt mit heißem Wasser ausgelaugt, das Filtrat

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

abgedampft, schließlich der Tiegel in dunkle Rotglut gebracht und das Chlorkalium gewogen.

Belege.

In 25 cm^3 wurden 0·0165 g KCl = 0·00865 g K gefunden oder in 500 cm^3 alkoholischer Digestion 0·173 g K.

In 2000 cm^3 des ursprünglichen Filtrats also 0·179 g K, welche 0·445 g Platin gebunden hatten.

Es betrug somit das Gesamtgewicht des ursprünglichen

Platins ..... 9·250 g
Platins, gebunden an Kali ..... 0·445 g
Verbleibt somit an Basen gebundenen Platins ..... 8·805 g Pt.

B. Der wässerige Anteil.

Nach alkoholischer Digestion wurde der Rückstand im Wasser aufgelöst, ein kleiner, nicht löslicher Teil auf dem Filter festgehalten und mit Salpeter und Soda, behufs Feststellung des Phosphors, verbrannt, wobei gefunden wurde, daß Phosphor in der unlöslichen Partie nicht vorhanden ist.

Das wässerige Filtrat des phosphorhaltigen Rückstandes verdünnten wir demnach auf 250 cm^3, hiervon wurden 25 cm^3 für die neuerliche Bestimmung des Phosphors nach der alkoholischen Digestion abgetrennt, um zu kontrollieren, ob ein Teil des Phosphors nicht in die alkoholische Fraktion übergegangen sei. Das war tatsächlich auch der Fall, und zwar wurden in 25 cm^3: 0·0434 g $Mg_2P_2O_7$ = 0·0121 g P gefunden, somit berechnet auf das Gesamtfiltrat:

von 250 cm ..... 0·1210 g P
wobei jedoch vorhanden sein sollten ..... 0·2624 g P
0·1414 g P,

welch letztere daher in die alkoholische Digestion übergegangen sind, d. i. 54·01%, also über die Hälfte.

Darauf sind wir leider erst dann gekommen, als das Filtrat nach der Ausscheidung des Cholins durch Platinchlorid aus der alkoholischen Fraktion bereits anderweitig verarbeitet war, so daß es zu einem Versuche, sicherzustellen, in welcher

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Form, offenbar einer organischen (anorganischer Phosphor würde in dem Bariumniederschlage gleich nach der Verseifung zurückgeblieben sein) dieser Phosphor, als in Alkohol löslich, vorhanden war, nicht mehr kam.

Die nächste Erklärung wäre gewesen, ob nicht vielleicht beim Abdampfen des Filtrats nach der Verseifung, als etliche Tropfen Salzsäure zur Überführung der freien Cholinbase in Chlorhydrat hinzugetan wurden, der Überschuß an Salzsäure die Zersetzung eines Teiles des Bariumglycerinphosphates in freie, allerdings in Alkohol lösliche Glycerinphosphorsäure verschuldet hat, welch letztere sich eventuell an das wie nachgewiesen vorhandene Kali hätte binden und als ebenfalls in Alkohol lösliches glycerinphosphorsaures Kali in diesen alkoholischen Teil hätte übergehen können.

Diese Umstände hätte ein Überschuß von Salzsäure verschulden müssen, von welcher jedoch, wie oben angeführt, bloß etliche Tropfen hinzugefügt wurden und dann hätte ein bedeutender Überschuß derselben vorhanden sein müssen, um mehr als die Hälfte des gesamten Glycerinphosphates frei zu machen.

Es erübrigt noch die Möglichkeit zu erwähnen, daß vielleicht jener Phosphor sich schon als Kaliumglycerinphosphat im Filtrate nach der Verseifung befunden habe, wiewohl es nicht gut denkbar ist, daß dasselbe der Wirkung des Barythydrats beim Kochen widerstanden hätte.

Hoppe-Seyler spricht die Ansicht aus, daß der Lecithincharakter des Chlorophylls definitiv gelöst wäre, wenn es gelingen würde, quantitativ das Cholin und die Glycerinphosphorsäure zu isolieren und es sich zeigen würde, daß ihre Mengen ihrem theoretischen Verhältnisse im Lecithinmolekül entsprechen. Dieses Verhältnis ist jedoch selbst im Eilecithin herzustellen nicht möglich, und zwar infolge des nicht quantitativen Verlaufs der Isolierungsmethoden.

Allein auch nicht einmal das Verhältnis des N : P, welches von uns im Rohchlorophyll des Efeus sichergestellt worden ist, stimmt mit dem theoretischen Verhältnis im Lecithin nicht überein. Im Rohchlorophyll des Efeus fand ich N : P = 1 : 0·267.

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Auch nicht einmal das Verhältnis des Platins (aus den ausgeschiedenen Platinbasen) zu Phosphor entsprach den theoretischen Ziffern. Das Verhältnis des Phosphors zum Platin im Lecithin ist — 1 : 6·28, in unserem Falle, umgerechnet auf den Gesamtphosphor des Filtrats, ist das Verhältnis des Phosphors zum Platin 1 : 27·8 oder im Hinblick zu dem, nach der alkoholischen Digestion übrig gebliebenen Phosphor —1 : 60·6. Die richtigste Ziffer in diesem Verhältnisse Pt : P bei der Beurteilung des Hoppe-Seyler'schen Lecithincharakters des Chlorophylls wäre die des Phosphors in dem isolierten Baryumglycerinphosphat. Die Menge von 0·212 *g* des isolierten Bariumglycerinphosphats umgerechnet auf das ursprüngliche Filtrat nach der Verseifung (inklusive der Korrektur der Isolationsverluste von zirka 22 %) = 0·3096 *g* Bariumglycerinphosphat = 0·0279 *g* P; es wäre also das Verhältnis P : Pt = 1 : 233·6. Es war auch nur ein kleines Prozent P an Glycerin gebunden. Im ursprünglichen Filtrat nach der Verseifung betrug der gesamte Phosphor 0·2691 *g*, während der isolierte Phosphor in Form von Glycerinphosphorsäure, auch die Isolationsverluste mit eingerechnet 0·0279 *g* P, d. h. bloß 10·4 % des gesamten, an Glycerin gebundenen Phosphors ausmacht.

Aus den angeführten analytischen Resultaten schließen wir, daß in dem alkoholischen Extrakte und der aus demselben gewonnenen Benzollösung des Rohchlorophylls Stoffe vorhanden sind, welche durch die Verseifung Basen liefern, deren Platinsalze durch den Gehalt an Platin auf Cholinbasen deuten würden. Betaine waren nicht vorhanden.

Das Vorhandensein organischen Phosphors wurde dagegen bestimmt nachgewiesen, und zwar teilweise (10·4 %) an Glycerin als Glycerinphosphorsäure gebunden.

Naturgemäß könnte die keineswegs unbegründete Einwendung entstehen, daß dieser organische Phosphor von den beigemengten farblosen Lecithinen, respektive Phosphatiden oder endlich von Posternaks Phytin herrühre, durchwegs Stoffe, welche im Pflanzenreiche verbreitet sind, und zwar nicht bloß in den Samen, sondern auch in den Blättern, so daß sie leicht in die alkoholischen Extrakte der grünen Blätter und von hier teilweise auch in die Benzollösung gelangen konnten.

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Roscoe-Schorlemmer, Stoklasas »Chlorolecithin« besprechend, hält den Lecithincharakter des Chlorophylls von dem Beweise abhängig, das die farblosen Lecithine diese Gegenwart des Phosphors nicht verschulden. Zur Sicherstellung dieses Umstandes verschafften wir uns ein Benzolextrakt von Efeublättern, einer Pflanze, die, wie wir fanden, zu Chlorophyllarbeiten eigentlich am wenigsten taugt, da die Blätter von einer großen Menge Wachs eingehüllt sind, welches die Arbeiten sehr erschwert. Allein in der Winterszeit, in welcher wir an die Lösung der Frage, betreffend das Nichtvorhandensein organischer, Phosphor enthaltender Stoffe im Rohchlorophyll herantraten, hatten wir kein anderes Material zur Verfügung.

Beweis der Abwesenheit der farblosen Phosphatiden eventuell des Phytins.

Zur Extraktion wurden 18 *kg* mit Wasser durchgewaschener Efeublätter verwendet. Um zunächst die oberflächliche Wachsschichte, mit welcher diese immergrüne Pflanze bedeckt ist, zu entfernen, wurden die Blätter durch zwei Tage in 12 Liter Äther liegen gelassen.

Die so von der Oberflächenwachs- und der Fettschichte befreiten Blätter wurden getrocknet, in einer Emailmühle zermahlen und in bekannter Weise in 36 *l* Alkohol extrahiert. Hierauf wurde filtriert und die alkoholische Lösung geschüttelt, im ganzen mit 10 *l* Benzol. Es wurden 8·2 *l* Benzollösung gewonnen, dieselbe abgedampft, der Rückstand abermals in Benzol gelöst, in diesem genau so wie das erstemal erhaltenen Rohchlorophyll wurde der Beweis der Abwesenheit der farblosen Phosphatide, beziehungsweise Phytine durchgeführt.

Vor allem wurde nun der Gesamtphosphor und Stickstoff bestimmt. 300 cm^3 der Lösung wurden abgedampft, der Rückstand im Wassertrockenschrank getrocknet und mit Soda und Salpeter in bekannter Weise verbrannt. Schließlich wurde das $Mg_2P_2O_7$ gewogen.

I. 1·756 *g* der Trockensubstanz = 0·0196 *g* $Mg_2P_2O_7$ = 0·00545 *g* P = 0·31% P.

Wie ersichtlich, ist in Efeu auch das Phosphorprozent gegenüber den Ziffern in anderen Pflanzen ein sehr geringes;

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

übrigens ist auch aus dem Gewicht der Trockensubstanz zu ersehen, daß es hier sehr viele Verunreinigungen gibt. Während 250 cm^3 Spinatextrakt gegen 0·6 g Rückstand liefern, haben 250 cm^3 Efeuextrakt 1·756 g Rückstand geliefert, also die dreifache Menge.

Schließlich dürfen wir nicht vergessen, daß die hier verarbeiteten Pflanzen zur Winterszeit (10. Jänner) gepflückt wurden, und daß die grüne Farbe der Blätter in dieser Zeit jene frische bläuliche Nuance des Grünen vermissen ließ. Der Assimilationsapparat befindet sich demnach trotz alldem nicht in voller Tätigkeit. Wir haben den Beweis mit Hilfe von Tierkohle zu liefern versucht, um das Chlorophyll nach der Methode Gautier's zu adsorbieren, allein in den Vorversuchen haben wir gefunden, daß Tierkohle einigermaßen das Lecithin angreift, so daß diese Methode nicht einwandfrei wäre.

A. Trennung mit Aceton.

Das Rohchlorophyll löst sich im Aceton sehr leicht; dagegen sind die Lecithine in diesem Agens nur sehr wenig löslich, so daß man sich des Acetons zur Ausscheidung der Phosphatide aus ihren alkoholischen Lösungen bedient. Wir haben versuchsweise in Lecithinpräparaten sichergestellt, daß die Lecithine im Aceton nicht ganz unlöslich sind, wie die Literatur hie und da angibt; wir haben dagegen gefunden, daß z. B. nach 2 Minuten langer Digestion 7% Lecithin in das Aceton übergegangen sind; nachdem geschüttelt worden, übergingen nach weiteren 10 Minuten 13·4% und nach einer weiteren Stunde 22·5%. Nach dreitägiger Digestion bestimmten wir abermals den Phosphor. Es waren 27·5% Lecithinphosphor in die Acetondigestion, d. i. zusammen 70·4% des Gesamtlecithins nach dreitägiger Digestion in Aceton übergegangen.

Belege:

100 cm^3 alkoholischer Lösung von bekanntem Lecithingehalte, entsprechend 0·01834 g P wurden abgedampft und mit Aceton digeriert. Es übergingen:

Nach 2 Minuten ..... 0·0048 $Mg_2P_2O_7$ = 0·0013 P = 7·0%
Nach weiteren 10 Minuten ..... 0·0089 $Mg_2P_2O_7$ = 0·00240 P = 13·4%
Nach einer weiteren Stunde ..... 0·0149 $Mg_2P_2O_7$ = 0·00414 P = 22·5%
Nach weiten 3 Tagen ..... 0·0182 $Mg_2P_2O_7$ = 0·00506 P = 27·5%
insgesamt: 70·5%

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Der Chlorophyllrückstand löst sich ungemein leicht in Aceton, d. h. selbst bei Bereitung einer konzentrierten Lösung (1 *g* des Rückstandes von Efeurohchlorophyll in 50 cm^3) ist in einer Minute alles in Lösung übergegangen. Um sicherzustellen, ob vielleicht bei Gegenwart des Chlorophylls nicht irgend eine Adsorption der farblosen Lecithine durch das Chlorophyll erfolgt, mengten wir (und das vor der Abdampfung) die Lecithine zu dem letzteren. Hierauf wurde mit Aceton digeriert, bis sich die neuen Partien desselben nicht mehr färbten (dreimal während einer Minute) und in dieser acetonischen Digestion der Phosphor bestimmt.

Belege:

350 cm^3 alkoholischen Chlorophylls, welche 0·00545 *g* Phosphor entsprechen, wurden 50 cm^3 alkoholischer Lecithinlösung hinzugefügt, entsprechend 0·0917 *g* Phosphor; dieses Gemenge wurde abgedampft und mit Aceton digeriert.

Die acetonigen Partien wurden abgedampft und der Phosphor bestimmt. Es wurden 0·0462 *g* $Mg_2P_2O_7$ abgewogen, das ist 0·0128 *g* Phosphor. Ziehen wir den Chlorophyllphosphor (0·0128—0·0054) ab, so bleiben aufs Lecithin 0·0074 *g* Phosphor übrig, d. h. es sind somit 8·1% farblosen Lecithins in das Chlorophyll übergegangen. Berücksichtigen wir aber die Summe des Chlorophyll- und Lecithinphosphors in dem Gemenge vor der acetonischen Digestion, d. i. 0·0971 *g* P und den in das Aceton übergegangenen Phosphor, d. h. 0·0128 *g*, so finden wir, daß von demselben bloß 13·3% übergegangen sind, d. i. eine Abnahme im acetonigen Teile von 86·7% P. Wenn wir jedoch unsere Chlorophyllrückstände mit Aceton digerierten, fanden wir, daß der Phosphor im Acetonteil nicht abnahm, sondern im Gegenteil prozentuell auf die Trockensubstanz, zugenommen hatte.

Bei 30° C. wurden sodann 500 cm^3 Chlorophyllbenzollösung abgedampft, der Rückstand 5mal im Laufe von 24 Stunden digeriert (die Digestionswässer wurden jenen hinzugefügt, in welchen wir, wie wir weiter ausführen werden, das Phytin bestimmen wollten). Diese Wässer waren nur schwach gelb verfärbt. Der Rückstand wurde in absolutem Äthylalkohol aufgelöst und diese Lösung mit Benzol ausgeschüttelt.

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

Die benzolige Partie wurde bei 30° C. abgedampft und mittels Acetons digeriert, die zweite acetonige Partie, welche nur wenig grün verfärbt war, wurde nicht zu der Hauptpartie hinzugefügt. Die acetonige Hauptpartie wurde abgedampft und im Rückstande der Phosphor bestimmt.

Belege:

I. 1·129 *g* Rohchlorophylls. Abgewogen 0·0163 *g* $Mg_2P_2O_7 = 0·0045$ *g* P, d. i. 0·4% P.

Der Phosphorgehalt stieg durch diese Operation von 0·31% in der ursprünglichen benzoligen Lösung auf 0·4%, d. i. fast um ein Drittel. Wir dürfen allerdings nicht übersehen, daß wir durch die Lösung in Aceton auch andern Reinigungsoperationen zuvorgekommen sind, durch welche verschiedene Verunreinigungen beseitigt wurden, keineswegs aber eventuell das farblose Lecithin, und daß durch die Verringerung der Quantität des Rückstandes der Phosphorgehalt relativ gestiegen ist. Deshalb unternahmen wir nachstehenden Parallelversuch: Wir dampften bei 30° C. je einen Liter benzoliger Lösung ab. Der Rückstand wurde in einem Falle neuerdings in Benzol gelöst, im zweiten mit Aceton digeriert und in beiden Fällen der Phosphor bestimmt.

Belege:

I. 5·736 *g* des Benzolrückstandes.
Abgewogen 0·07 *g* $Mg_2P_2O_7 = 0·0195$ *g* P, d. i. 0·33% P.
II. 5·710 *g* des Acetonrückstandes.
Abgewogen 0·0636 *g* $Mg_2P_2O_7 = 0·0177$ *g* P, d. i. 0·31% P.

Dieses unbedeutende Sinken des Phosphorgehaltes im Acetonrückstande kann keinerlei Einfluß auf die Deduktion über die Abwesenheit der farblosen Lecithine haben, nachdem vom Lecithinphosphor bei so kurzer Digestion (p. 542) mit Aceton, 7% übergingen, während aus den angeführten Belegen klar ist, daß vom Phosphor des Rohchlorophylls 94% in die Acetonlösung übergegangen sind. Mit Rücksicht auf diese Beweise über die Abwesenheit der farblosen Lecithine ist die Erkenntnis interessant, zu der Just gelangt ist, nämlich, daß die ursprünglichen alkoholischen Extrakte der grünen Blätter

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

eine Reaktion mit alkoholischen Lösungen von Chlorplatinsäure gaben, während die alkoholische Lösung des, bereits von uns in der in dieser Arbeit wiederholt beschriebenen Weise gereinigten Rohchlorophylls (die ursprüngliche alkoholische Lösung wurde mit Benzol ausgeschüttelt, die benzolige Partie abgedampft und in absolutem Alkohol gelöst), diese Reaktion nicht mehr lieferte. Die also eventuell vorhandenen farblosen Lecithine würden demnach aus den alkoholischen Extrakten in den benzoligen Anteil nicht übergehen.

B. Beweis der Abwesenheit von Phytin.[1]

Um festzustellen, ob der vorhandene Phosphor im benzoligen Anteil des alkoholischen Rohchlorophyllextrakts nicht Phytinphosphor ist, oder eventuell die Menge dieses Phytinphosphors quantitativ zu bestimmen, sind wir in folgender Weise vorgegangen:

Der Rückstand, der nach dem Abdampfen (560 cm^3 der benzoligen Rohchlorophyllösung) des Benzols zurückblieb, wurde achtmal mit Wasser, hernach achtmal mit stark verdünnter Salzsäure digeriert. Zur sauern Digestion wurde Natriumacetat hinzugefügt. Die wässerige Digestion (es wurden auch die Waschwässer, die bei der Beweisführung über das Fehlen des farblosen Lecithins gewonnen wurden hinzugefügt) hatte einen etwas gelblichen Stich, während die saure Digestion einen Stich ins Grüne zeigte. Beide wurden hierauf vereinigt, in einen kleineren Teil Kupferacetat hinzugetan, doch es trat weder ein Niederschlag, noch überhaupt eine Trübung ein. Um sicherzustellen, ob überhaupt Phosphor in dieser sauern Digestion vorhanden ist, wurde der restliche Teil der Lösung im Wasserbade abgedampft, der Rückstand mit Soda und Salpeter verbrannt und hierauf nach Ansäuerung und Konzentration, Molybdensolution hinzugefügt. Weder nach 3 stündigem Erwärmen (60 bis 70°), noch über Nacht entstand eine Trübung. Es war also weder Phytin noch irgend eine phosphorhaltige, im Wasser lösliche Substanz vorhanden, so, wie es vorauszusetzen war, da es sich doch um einen alko-

[1] Posternak, Comptes r., p. 202, 337, 439 (1903).

om The Biodiversity Heritage Library http://www.biodiversitylibrary.org/; www.biol

holischen Blätterextrakt handelte, in den nur schwer Phytin übergehen könnte.

Resumé.

Nachdem sich physiologisch nachweisen läßt, daß eine bestimmte Beziehung zwischen der Bildung des Chlorophylls und der Gegenwart des Phosphors in der Pflanzenzelle besteht;

da sich ferner der Phosphor immer im alkoholischen, eventuell im benzoligen Extrakte der grünen Blätter, und zwar in nicht unbedeutenden Mengen vorfindet und er weder den anorganischen, phosphorhaltigen Beimengungen, noch auch den farblosen Phosphatiden angehört, so können wir daraus schließen, daß der Phosphor einen wichtigen Bestandteil des Chlorophylls bildet.

In dem teilweise gereinigten Rohchlorophyll wurde ferner eine dem Cholin nahestehende Base und Glycerinphosphorsäure nachgewiesen.

Der gesamte vorhandene Phosphor ist nicht bloß an Glycerin gebunden. Auch das festgestellte quantitative Verhältnis N : P oder Pt : P entspricht nicht dem theoretischen Verhältnisse des einfachen Lecithinmoleküls.

Es gehört daher anscheinend das Chlorophyll — als ein Komplex einzelner seiner Pigmente — zu jener großen Gruppe von Phosphatiden, in welchen auch die Kohlenhydrate (Winterstein und Hiestand[1]) eine solche Komponente bilden und das Magnesium (Willstätter) und vielleicht das Kalium in seiner physiologischen Bedeutung ergänzen.

---

[1] Winterstein und Hiestand, »Beiträge zur Kenntnis der pflanzlichen Phosphatide«, Zeitschr. für physiolog. Chemie, Bd. LIV, p. 326.